

10/539534

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月15日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/058981 A1

(51) 国際特許分類7:

C12N 15/85

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 駒町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2003/016549

(22) 国際出願日:

2003年12月24日 (24.12.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-371621

2002年12月24日 (24.12.2002) JP
特願2003-76877 2003年3月20日 (20.03.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 梅田 一彰 (UMEDA,Kazuaki) [JP/JP]; 〒520-0845 滋賀県大津市若葉台11-50 チュリス石山209 Shiga (JP). 松井毅 (MATSUI,Takeshi) [JP/JP]; 〒600-8813 京都府京都市下京区中堂寺南町107 上原マンション405 Kyoto (JP). 中山 真由美 (NAKAYAMA,Mayumi) [JP/JP]; 〒600-8899 京都府京都市下京区西七条赤社町32-1102 Kyoto (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HIGHLY EFFICIENT GENE TARGETING VECTOR AND GENE TARGETING METHOD TOWARD EPITHELIAL CELL LINE

(54) 発明の名称: 高効率遺伝子ターゲッティングベクターおよび上皮細胞株に対する遺伝子ターゲッティング法

WO 2004/058981 A1
 (57) Abstract: In the course of constructing a ZO-1 gene knockout mouse, a gene targeting vector causing homologous recombination at a high possibility of 90% or more is developed. As the results of studies on the optimum conditions for electroporation of epithelial cells with the use of this targeting vector, the optimum electroporation conditions enabling efficient gene targeting toward mouse EpH4, which is an epithelial cell line, are successfully determined. Use of this vector makes it possible to easily introduce a foreign gene to the ZO-1 allele of an ES cell. Since it is unnecessary to take the effects of genome structure into consideration, this method is expected as contributing to the solution of problems occurring in the existing methods of constructing transgenic mice and preparing transformants with stable cells.

(57) 要約: ZO-1遺伝子のノックアウトマウスを作製する過程で、相同組換えが90%以上の高い確率で起こる遺伝子ターゲッティングベクターを開発した。また、該ターゲッティングベクターを用いて上皮細胞に対するエレクトロポレーションの至適条件の検討を行った結果、上皮細胞株であるマウスEpH4に対して効率的な遺伝子ターゲッティングが可能なエレクトロポレーションの至適条件の決定に成功した。本発明のベクターを利用することにより、ES細胞に対して外来遺伝子をZO-1のアリルに容易に導入することが可能となる。また、ゲノム構造の影響を考慮しなくも良いため、従来のトランスジェニックマウス作製法や細胞の安定なトランスフォーマント作製時の欠点が解決できることが期待される。

明細書

高効率遺伝子ターゲッティングベクターおよび上皮細胞株に対する
遺伝子ターゲッティング法

5

技術分野

本発明は、高効率で遺伝子ターゲッティング可能なベクターに関する。また本発明は、上皮細胞株、特にマウス上皮細胞株 EpH4 に対する効率的な遺伝子ターゲッティング方法に関する。

10

背景技術

遺伝子ターゲッティング (gene-targeting; 非特許文献 1 / A. L. Joyner 著、『Gene Targeting Second Edition』、オックスフォード大学出版 (OXFORD University Press) 参照) とは、外来性の DNA 断片を哺乳類の細胞に導入し、内在性の DNA シーケンスとの間に相同組換えを起こさせる遺伝子破壊法もしくは遺伝子導入法である。この方法は特にマウスの胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) において、多くの遺伝子に様々な変異を作り出すこと、または外来性遺伝子を発現させることに広く用いられている。この ES 細胞をマウスに戻すことにより、目的遺伝子が欠失したマウス、または外来性遺伝子を発現させたマウスを作製することができる。これらのマウスの表現型を個体内で解析することにより、目的遺伝子の生体内における機能を類推することができる。しかし、一般的にこの相同遺伝子組換えの頻度は、外来遺伝子が導入された細胞の 1~0.1% という非常に低い頻度でしか起こらない。この効率が上がれば、遺伝子を自由に改変することが容易に可能になり、様々な医療、研究分野での応用が期待できる。しかしながら、これまでのところ、高効率で遺伝子ターゲッティングが可能なベクターは知られていなかった。

上皮細胞とは、体表面、管腔面等を覆い細胞自身の中に明確な細胞極性を形成して特殊化することにより、それぞれの器官を環境の異なる閉じた空間に分ける機能を果たす一層もしくは数層の細胞シートのことをいう。ヒトの悪性腫瘍の90%以上は上皮細胞に由来することも明らかとなっており、上皮細胞の形成機構、維持機能を解析することは医学的にも重要である。しかし、上皮細胞の形成、機能に重要な遺伝子のノックアウトマウスにおいては発生初期から上皮細胞は形成されるため、詳細な解析は出来ない場合が多い。

従来、遺伝子相同組換えを応用した遺伝子ターゲッティング法（上記非特許文献1参照）は主にマウスES細胞で行われているが、分化した体細胞における相同組換えの効率は0.01～0.001%であり、非常に低いことが知られている（非特許文献2／Sedivy JMおよびDutriaux A著、「Gene targeting and somatic cell genetics-a rebirth or a coming of age?」、Trends Genet.、1999年、Vol. 15、p. 88-90参照）。

従って、上皮細胞に対する遺伝子ターゲッティングは極めて困難であり、これまでのところ、上皮細胞を対象とする効率的な遺伝子ターゲッティング方法は知られていなかった。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、高効率な遺伝子ターゲッティングベクターを提供することである。また、上皮細胞株、特にマウス上皮細胞株EpH4に対する効率的な遺伝子ターゲッティング方法を提供することにある。

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。本発明者は、上皮細胞においてタイトジャンクション(tight junction)の裏打ちタンパク質として局在するZO-1遺伝子のノックアウトマウスを作製する過程で、相同組換えが90%以上の高い確率で起こるターゲッティングベクター(targeting vector)を開発し

た。そして、該ベクターを用いて上皮細胞に対するエレクトロポレーションの至適条件の検討を行った。その結果、上皮細胞株であるマウス Eph4 に対して効率的な遺伝子ターゲッティングが可能なエレクトロポレーションの至適条件を決定し、本発明を完成させた。

5 本発明のベクターを利用することにより、ES 細胞に対して外来遺伝子を ZO-1 のアリル (allele) に容易に導入することが可能となる。本発明のターゲッティングベクターによって得られたシングルノックアウト ES 細胞、および、このシングルノックアウト ES 細胞をマウスに戻して作製された、ヘテロマウスにおいては何ら表現型が見いだされないことから、ZO-1 の一方のアリルに外来遺伝子を導入することは細胞の機能には影響がないと考えられる。このことは外来遺伝子を発現させる場合、ゲノム構造の影響を考慮しなくても良い利点がある。すなわち、従来のトランスジェニックマウス作成法や細胞の安定なトランスフォーマント (stable transformant) 作成時の欠点が解決出来ることが予測される。

10 また、これまで体細胞での遺伝子ターゲッティング効率は非常に低いとされていたが（外来遺伝子が導入された細胞の0.01～0.001%）、本発明による遺伝子導入条件の至適化により、上皮細胞株Eph4においても外来遺伝子が導入された細胞の約10%で相同組換えが起こることが示された。

15 本発明の遺伝子ターゲッティング方法を用いることにより、上皮細胞において発現している遺伝子の機能を効率的に解析できるものと期待される。また、悪性腫瘍形成に関わる遺伝子を破壊する、もしくは該遺伝子の変異体をノックインによりゲノム上に導入することができるため、遺伝子改変を行った上皮細胞における薬剤スクリーニング系の開発が可能になるものと考えられる。

20 また現在、いくつかの細胞株しか相同組換えによる遺伝子ターゲッティングは成功していないが、薬剤スクリーニングや病態の解析に適した細胞株に対し、このベクターを用いて遺伝子ターゲッティングの条件検討を行うことにより、遺伝子破壊された細胞株を作製できる応用性も期待される。

上記の如く本発明者は、外来遺伝子導入動物を作製する際に、該動物における ZO-1 遺伝子を、外来遺伝子を導入するターゲット部位とすることにより、高効率に遺伝子ターゲッティングが可能であることを見出した。即ち、ZO-1 遺伝子をターゲット部位とするベクターは、高効率に外来遺伝子を導入できること、さら 5 に該ベクターを用いた上皮細胞、特にマウス上皮細胞株 Eph4 に対する遺伝子ターゲッティング方法を初めて見出し、本発明を完成させた。

本発明は、高効率遺伝子ターゲッティングベクター、および該ベクターを利用した上皮細胞、特にマウス上皮細胞株 Eph4 に対する遺伝子ターゲッティング方法に関し、より具体的には、

- 10 (1) 非ヒト動物の ZO-1 遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲッティングベクターであって、該外来遺伝子、および該 ZO-1 遺伝子の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするベクター、
- (2) 外来遺伝子の上流および／または下流に、ZO-1 遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する、〔1〕に記載のベクター、
- 15 (3) ZO-1 遺伝子の部分領域が、該遺伝子の第二エクソンまたは第二エクソンの一部を含む領域である、〔2〕に記載のベクター、
- (4) 下記の (a) または (b) のいずれかに記載の DNA 断片が外来遺伝子の両脇にそれぞれ配置された構造を有する、〔3〕に記載のベクター、
 - (a) ZO-1 遺伝子の第二エクソンの一部およびその上流を含む 1.5-kb の Bsp1286I- Bsp1286I 断片、および第二エクソンの下流の 8.5-kb の PstI-BamHI 断片
 - (b) ZO-1 遺伝子の第二エクソンの一部およびその上流を含む 5.1 kb の PstI-BsrDI 断片、および第二エクソンの下流の 3.9 kb の PstI-SphI 断片
- 25 (5) 非ヒト動物の ZO-2 遺伝子もしくは Disabled-2 遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲッティングベクターであって、該外来

- 5 -

遺伝子、および該 ZO-2 もしくは該 Disabled-2 遺伝子の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするベクター、

[6] 外来遺伝子の上流および／または下流に、ZO-2 遺伝子もしくは Disabled-2 遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する、

5 [5] に記載のベクター、

[7] 外来遺伝子発現非ヒト動物または外来遺伝子発現非ヒト動物細胞の作製用ベクターである、[1]～[6] のいずれかに記載のベクター、

[8] 外来遺伝子の上流に該遺伝子を転写し得るプロモーターを備えた、

[1]～[7] のいずれかに記載のベクター、

10 [9] さらにマーカー遺伝子発現カセットを含む、[1]～[8] のいずれかに記載のベクター、

[10] マーカー遺伝子発現カセットの下流に外来遺伝子が隣接して配置された構造を有する、[9] に記載のベクター、

[11] 外来遺伝子がマーカー遺伝子発現カセットである、[1]～[6] のいずれかに記載のベクター、

[12] マーカー遺伝子発現カセットが薬剤耐性遺伝子発現カセットである、[9]～[11] のいずれかに記載のベクター、

[13] 薬剤耐性遺伝子発現カセットが β -geo を含むDNA断片である、[12] に記載のベクター、

20 [14] 非ヒト動物がマウスである、[1]～[13] のいずれかに記載のベクター、

[15] 上皮細胞に対する遺伝子ターゲッティング方法であって、電圧0.4～0.5kVおよびコンデンサー容量125～250 μ Fの条件によるエレクトロポレーションにより、ターゲッティングベクターを該細胞へ導入することを特徴とする、ターゲッティング方法、

[16] エレクトロポレーションへ供される細胞調製液中のカルシウム濃度が

5 μ M以下である、〔15〕に記載の方法、

〔17〕 ターゲッティングベクターが、細胞の染色体上のZ0-1遺伝子、Z0-2遺伝子、またはDisabled-2遺伝子を標的とするものである、〔15〕または〔16〕に記載の方法、

5 〔18〕 ターゲッティングベクターが、〔1〕～〔13〕のいずれかに記載のベクターである、〔15〕または〔16〕に記載の方法、

〔19〕 上皮細胞が高等動物細胞由来である、〔15〕～〔18〕のいずれかに記載の方法、

〔20〕 高等動物がマウスである、〔19〕に記載の方法、

10 〔21〕 細胞がマウス上皮細胞株Eph4である、〔20〕に記載の方法、

〔22〕 〔15〕～〔21〕のいずれかに記載のターゲッティング方法によつてターゲッティングベクターを上皮細胞株へ導入することを特徴とする、染色体が人為的に改変された上皮細胞株の製造方法、

を提供するものである。

15 本発明は、外来遺伝子を高効率に導入可能な遺伝子ターゲッティングベクターに関する。

本発明は、非ヒト動物のZ0-1遺伝子領域、Z0-2遺伝子領域、またはDisabled-2遺伝子領域を、外来遺伝子挿入のための標的部位とすることを特徴とする、ターゲッティングベクターを提供する。

20 本発明は、非ヒト動物のZ0-1遺伝子領域、Z0-2遺伝子領域、またはDisabled-2遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲッティングベクター（単に、「ベクター」と記載する場合あり）を提供する。本発明のベクターは、外来遺伝子発現非ヒト動物または外来遺伝子発現非ヒト動物細胞の作製に有用である。

25 Z0-1遺伝子の塩基配列は既に知られており、当業者においては、Z0-1遺伝子の塩基配列についての情報を公共の遺伝子バンクから容易に取得することが可能

である。例えば、マウス ZO-1 遺伝子の塩基配列についての情報は、GenBank からアクセッション番号 NM_009386 により取得することができる。また、ZO-2 遺伝子の塩基配列についての情報は、GenBank からアクセッション番号 NM_011597、Disabled-2 遺伝子の塩基配列についての情報は、GenBank アクセッション番号：5 NM_023118 より取得することができる。ZO-1 遺伝子の塩基配列の一例として、GenBank からアクセッション番号 NM_009386 により取得されるマウス ZO-1 遺伝子の塩基配列を配列番号：1 に示す。

本発明のベクターは、外来遺伝子、および ZO-1 遺伝子、ZO-2 遺伝子領域、または Disabled-2 遺伝子領域の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするターゲッティングベクターである。本発明のベクターを利用することにより、10 外来遺伝子が染色体へ挿入された外来遺伝子導入動物を作製することが可能である。

「遺伝子ターゲッティング」とは、同じ塩基配列を有する DNA 分子間で起こる相同組換えという現象を利用して、人為的に染色体上の遺伝子を改変することを 15 言う。この「改変」には、遺伝子破壊もしくは遺伝子挿入が含まれる。つまり、染色体上の標的配列と相同的な配列を有するベクターを細胞へ導入することにより、相同部分で組換えが起こり、ベクター（もしくは、その一部）が染色体へ挿入される。

本発明の好ましい態様においては、外来遺伝子が挿入される染色体部位（標的 20 部位）の両脇の DNA 領域と相同的な塩基配列からなる DNA 断片が、該外来遺伝子の両脇に配置された構造を持つベクターである。本発明の上記ベクターを細胞へ導入すると、外来遺伝子の両脇の相同 DNA 領域と、標的部位の両脇の DNA 領域との間で、相同組換えが起こり、外来遺伝子が染色体上の標的部位へ挿入される。

本発明において外来遺伝子の挿入の標的となり得る染色体上の DNA 部位は、ZO-1 遺伝子、ZO-2 遺伝子、または Disabled-2 遺伝子上であれば特に制限されず、25 エクソン、イントロン、またはプロモーター等の遺伝子発現制御領域であっても

よい。従って本発明のベクターの好ましい態様としては、外来遺伝子の上流および/または下流に、Z0-1 遺伝子、Z0-2 遺伝子、またはDisabled-2 遺伝子の全領域もしくはこれら遺伝子の部分領域が配置された構造を有する。

また、外来遺伝子は Z0-1 遺伝子、Z0-2 遺伝子、またはDisabled-2 遺伝子上 5 であれば任意の領域へ挿入することが可能である。

例えば、Z0-1 遺伝子の場合には、好ましくは、Z0-1 遺伝子の第二エクソンまたは第二エクソンの一部を含む DNA 領域へ挿入される。従って、本発明のベクターに含まれる Z0-1 遺伝子の領域としては、例えば、Z0-1 遺伝子の第二エクソン全体もしくは第二エクソンの一部を含むような Z0-1 遺伝子上の DNA 領域である 10 ことが好ましい。上記の第二エクソンの一部を含む DNA 領域の具体例としては、例えば、(a) 第二エクソンの一部およびその上流を含む 1.5-kb の Bsp1286I-Bsp1286I 断片、および第二エクソンの下流の 8.5-kb の PstI-BamHI 断片、あるいは、(b) 第二エクソンの一部およびその上流を含む 5.1 kb の PstI-BsrDI 断片、および第二エクソンの下流の 3.9 kb の PstI-SphI 断片を挙げることができ 15 るが、これに限定されない。

本発明のベクターとしては、例えば、上記の 2 つの断片がそれぞれ、外来遺伝子の上流部または下流部に配置された構造を有するベクターを示すことができる。

また本発明は、上皮細胞に対して効率的に遺伝子ターゲッティングを行うことが可能な方法を提供する。該ベクターの細胞への導入は、種々の方法が知られて 20 いるが、最も一般的な方法としては、エレクトロポレーション法を挙げができる。エレクトロポレーション法は、当業者においては一般的に市販されている機材を利用して、適宜、実施することができる。

本発明の方法は、エレクトロポレーションによってターゲッティングベクターを上皮細胞へ導入する工程を含む遺伝子ターゲッティング方法である。

25 本発明の方法においてエレクトロポレーションは、バイオ・ラッド社のジーン パルサーシステムII (パルスコントローラーPLUS使用) を用いて好ましくは電圧

0.4～0.5kV、コンデンサー容量125～250μF、更に好ましくは電圧0.45kVもしくはその近辺、コンデンサー容量125μFもしくはその近辺の条件で行う。これらのエレクトロポレーションの条件は、上皮細胞に対して高効率に遺伝子ターゲッティングを行うことが可能な条件として、本発明者らによって初めて決定されたものである。
5

また、エレクトロポレーションに供される細胞（培養液）の調製方法もまた、当業者においては一般的に公知の種々の方法によって適宜実施することができる。例えば、エレクトロポレーションに供される細胞は、カルシウムを添加することによって調製することができる。細胞間接着が強固な細胞の場合、細胞調製時に10カルシウム濃度を下げてエレクトロポレーションを行うことにより、遺伝子導入効率が上昇することが本発明者らの研究により明らかとなった（後述の実施例2参照）。従って、細胞調製時の細胞培養液中に含まれる最終カルシウム濃度は、特に限定されるものではないが、好ましくは5μM以下である。

本発明の上記方法に使用されるターゲッティングベクターとしては、例えば、15上述のベクターを好適に示すことができる。即ち、本発明の好ましい態様としては、上述の上皮細胞の染色体上のZ0-1遺伝子（GenBankアクセスション番号：NM_09386）、Z0-2遺伝子（GenBankアクセスション番号：NM_011597）、またはDisable d-2遺伝子（GenBankアクセスション番号：NM_023118）を標的とするものであるが、これらに特に制限されるものではなく、上皮細胞の染色体上の任意のDNA領域を20標的とするように構築することができる。

また、本発明の上記方法に用いられるターゲッティングベクターは、上皮細胞の染色体上の標的となる遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するものである。本発明の上記方法に用いられるターゲッティングベクターとして、例えば、前述の外来遺伝子およびZ0-1遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するベクター25（「Z0-1ベクター」と記載する場合あり）を挙げることができる。

また、本発明のベクターの一例として、Z0-2遺伝子を標的とするターゲッティ

ングベクター (Z0-2ベクター) を挙げることができる。Z0-2ベクターは、外来遺伝子および／またはZ0-2遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するベクターであり、より具体的には、該Z0-2ベクターは、Z0-2遺伝子の第3エクソンを欠損するよう5 に該遺伝子領域を含むベクターである。該ベクターは、例えば、第3エクソンの上流の6.6-kbのKpnI-HindIII断片、および第3エクソン下流の2.6-kbのScaI-SpeI断片を用いて作製される。

また、本発明のベクターとして、例えば、Disabled-2遺伝子を標的とするターゲッティングベクター (Disabled-2ベクター) を挙げることができる。Disabled-2ベクターは、例えば、外来遺伝子および／またはDisabled-2遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するベクターである。より具体的には、該Disabled-2遺伝子の10 第3エクソンを欠損するよう15 に該遺伝子領域を含むベクターである。該ベクターは、例えば、第3エクソンの上流および下流それぞれ3.9-kbの断片を上皮細胞株E pH4のゲノムDNAを鋳型としたゲノミック (genomic) PCRにより取得することができる。その際、上流断片の3'側にEcoRVサイトを導入し、この新たに導入したサイトを利用することにより、サザンプロットを行うことが可能である。

本発明の上記外来遺伝子は、必ずしも制限されるものではないが、通常、タンパク質を発現し得る (タンパク質をコードする) 遺伝子である。上記したベクターによって発現させるタンパク質としては、天然または人工タンパク質であるかを問わず、所望のタンパク質を挙げることができる。天然のタンパク質としては20 例えば、分泌タンパク質、膜タンパク質、細胞質タンパク質、核タンパク質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、酵素、ペプチド等が挙げられる。人工タンパク質としては、例えば、キメラ毒素などの融合タンパク質、ドミナントネガティブタンパク質 (受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む) 、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子等が挙げられる。25 また、分泌シグナルや膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加したタンパク質であってもよい。また、アンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイム等を

- 11 -

発現させることにより、細胞における発現が望ましくない遺伝子について、その発現を抑制する、または遺伝子産物の機能を抑制することもできる。

本発明の上記外来遺伝子は、該遺伝子が転写し得るようにプロモーターと機能的に結合した構造、所謂「発現カセット」であることが好ましい。上記「機能的に結合した」とは、プロモーターの転写の活性化に伴い、下流の遺伝子の発現が誘導されるようにプロモーターと下流の遺伝子が結合していることを言う。

上記プロモーターとしては、遺伝子自体に本来備わっているプロモーターを挙げができるが、これ以外にも、発現させたい外来遺伝子の種類、および外来遺伝子を導入する細胞の種類等を考慮して、当業者においては公知のプロモーターから適宜選択して使用することができる。具体的には、サイトメガロウイルス(CMV)由来プロモーター、EF-1 α プロモーター、 β アクチンプロモーター、ラウス肉腫ウイルス由来(RSV)プロモーター、SV40プロモーター、TKプロモーター、PGKプロモーター、SR α プロモーター等を例示することができるが、特にこれらに制限されない。

上記ベクターに含まれる標的となる遺伝子領域と相同なDNA（単に、「相同DNA」と記載する場合あり）の長さは、相同組換えが生じ得る長さであれば特に制限されない。一般的に、相同領域は長いほど相同組換えの効率が高いことが知られていることから、本発明のベクターに含まれる標的となる遺伝子領域と相同なDNA領域も長いことが好ましい。通常、哺乳動物細胞、例えばマウスES細胞の相同組換えには、外来遺伝子両脇の「相同DNA」の合計が5-kb以上、少なくとも片側の長さは0.5～2-kb以上が好ましいとされている。従って、ベクターに含まれる「相同DNA」の長さは、通常、合計5-kb以上であり、外来遺伝子両脇に位置する「相同DNA」の長さは、片側において好ましくは0.5-kb以上、より好ましくは2-kb以上である。

また、染色体へ外来遺伝子が導入された細胞を選択するため、または外来遺伝子が導入されたことを確認するために、本発明におけるベクターは、マーカー遺

伝子発現カセットを含むことが好ましい。「マーカー遺伝子発現カセット」とは、マーカー遺伝子が発現するように構成されたカセットを指し、通常、マーカー遺伝子がプロモーター、IRES (Internal ribosome entry site) またはSA (splicing accepter) の一つあるいは複数と機能的に結合した構造を有するDNA断片である。

5 上記「マーカー遺伝子」としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子(neo)等の薬剤耐性遺伝子を利用することができる。薬剤耐性遺伝子を挿入した場合には、薬剤を含む培地で培養することにより相同組換えを生じた細胞株を選抜することができる。具体的には、マーカー遺伝子として、 β -geo (順に、LacZ, neo, polyA) 、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン等を好適に使用する

10 ことができる。

また、上記ベクターが上記マーカー遺伝子発現カセットを含む場合、該ベクターは、該発現カセットの下流(3' 側)に外来遺伝子が隣接して配置された構造であることが好ましいが、必ずしもこの構造に制限されるものではない。また、本発明の「外来遺伝子」が上記マーカー遺伝子発現カセットであってもよい。

15 また本発明のターゲッティングベクターには、標的となる遺伝子の全領域もしくは部分領域を有し、外来遺伝子を含まないベクターも含まれる。例えば本発明には、Z0-1遺伝子の全領域もしくは部分領域を有し、外来遺伝子を含まない遺伝子ターゲッティング用ベクターも含まれる。即ち、前記ベクターが提供されれば、適当なベクター上の部位へ、外来遺伝子、加えてマーカー遺伝子発現カセットをクローニングすることは、当業者においては通常行い得ることである。前記ベクターは、外来遺伝子、および必要に応じてマーカー遺伝子発現カセットを容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。該クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができます。これにより、該制限酵素部位に外来遺伝子、および必要に応じてマーカー遺伝子発現カセットを挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。

20

25

これらのクローニングサイトの設計および構築は、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術を用いて行うことが可能である。

さらに上記ベクターは、細胞へ導入された際にベクターを含む細胞を選択するために、必要に応じて上記マーカー遺伝子とは異なる種類の複数のマーカー遺伝子を備えたものであってもよい。

本発明に用いられるターゲッティングベクターの基本骨格は、特に制限はなく、例えば、pBluescript、pGEM vector（製造元プロメガ株式会社）、pUC vector（製造元タカラバイオ株式会社）等の市販のベクターを適宜利用することができる。当業者においては、例えば、市販のベクターを利用して、一般的な遺伝子工学技術によりターゲッティングベクターの構築が可能である。

本発明のベクターを利用して染色体へ外来遺伝子を導入することができる動物は、好ましくは、マウスを挙げることができるが、Z0-1遺伝子または該遺伝子のホモログを有する非ヒト動物であれば、特に制限されない。マウスZ0-1遺伝子のホモログとしてイヌZ0-1遺伝子が知られているが、基本的には、全哺乳類においてZ0-1遺伝子は発現していると考えられるため、本発明のベクターは全哺乳類に有用であると考えられる。

本発明の遺伝子ターゲッティング方法に供される細胞としては、例えば、高等動物細胞を好適に示すことができる。高等動物細胞としては、例えば、マウス、ペットや家畜、実験動物などで利用されているイヌ、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、ニワトリ、サル、ヒツジ、ヤギ、ネコ等の細胞を挙げることができる。

本発明の遺伝子ターゲッティング方法に供される細胞の具体例としては、マウス上皮細胞株EpH4 (Reichmann, E., Ball, R., Groner, B. and Friis, R. R. New mammary epithelial and fibroblastic cell clones in coculture form structures competent to differentiate functionally. *J. Cell Biol.* 1989; 108: 1127-1138) 、MTD-1A株 (Enami, J., S. Enami, and M. Koga. 1984. Isolat

ion of an insulin-responsive preadipose cell line and a mammary tumor-producing, dome-forming epithelial cell line from a mouse mammary tumor. Dev. Growth Differ. 1984; 26: 223-234)、CSG211株 (Wigley CB and Franks LM. Salivary epithelial cells in primary culture: Characterization of their growth and functional properties. J Cell Sci. 1976; 20: 149-165) 等を示すことができるが、最も好ましくはマウス上皮細胞株EpH4である。または、これらの細胞に由来する細胞もまた好適に使用することができる。

本発明の方法の好ましい態様においては、通常、本発明のターゲッティングベクターを上記の条件のエレクトロポレーションによって上皮細胞へ導入した後、10 該細胞の培養を行う。次いで、相同組換えによって外来遺伝子が染色体へ挿入された細胞を、適宜マーカー等を利用して選択する。

本発明の遺伝子ターゲッティング方法は、例えば、外来遺伝子導入細胞の作製に利用することができる。

外来遺伝子が染色体へ挿入され、該遺伝子を発現する細胞は、当業者において15 は、本発明のベクターを用いることにより、公知の方法によって容易に作製することができる。

また、本発明のベクターを用いた遺伝子導入非ヒト動物の作製は、例えば、マウスにおいては以下のようにして行うことができるが、この方法に制限されず、当業者においては、マウス以外の非ヒト動物においても一般的な遺伝子工学技術20 により、本発明のベクターを利用して遺伝子導入非ヒト動物を作製することができる。まず、任意の外来遺伝子を含む本発明のベクターを、エレクトロポレーション法等によりマウスのES細胞株へ導入し、相同組換えを生じた細胞株を選抜する。得られたES細胞株をマウス胚盤葉にインジェクションしキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、外来遺伝子がマウス染色25 体のZ0-1遺伝子対の一方へ導入されたマウスを得ることができる。さらに、このマウスを交配させることで、外来遺伝子がマウス染色体のZ0-1遺伝子対の双方へ

- 15 -

導入されたマウスを取得することができる。

本発明のベクターを利用した方法、あるいは本発明の上記方法によって染色体へ挿入された外来遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は *in situ*でも行うことが可能である。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンプロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。さらに、遺伝子導入の検出を容易にするため、発現させるタンパク質にタグを付加したり、10 外来遺伝子に加えてレポーター遺伝子を発現するようにベクターを構築することも可能である。レポーター遺伝子は、 β ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アルカリホスファターゼ、またはGFP(Green Fluorescent Protein)をコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに特に制限されず、当業者においては、細胞の種類等を考慮し、適当なレポーター遺伝子15 を適宜選択することができる。

本発明は、本発明のターゲッティング方法によってターゲッティングベクターを上皮細胞株へ導入することを特徴とする、染色体が人為的に改変された上皮細胞株の製造方法を提供する。本発明のターゲッティング方法によって導入されたターゲッティングベクターは、上皮細胞株へ導入された後、通常、上皮細胞染色20 体との間で相同組換えにより該ベクターもしくは該ベクターの一部が染色体へ挿入される。上記「染色体が人為的に改変された上皮細胞株」には、外来遺伝子が染色体へ挿入された上皮細胞株、あるいは内因性の遺伝子が改変された上皮細胞株等が含まれる。この改変とは、例えば、DNAの挿入、付加、欠失、置換等が挙げられる。

図1は、マウスZ0-1遺伝子座および遺伝子ターゲッティングベクターを模式的に示す図である。開始コドンは第1エクソンに存在する。

5 β -geo (LacZ/neo/polyA) を中央に含むターゲッティングベクターは第2エクソンの一部を除く形で作られている。サザンプロッティングに用いた3'側プローブを黒線で示した。

図2は、Z0-1シングルノックアウト細胞の作製結果を示す写真である。PvuII消化したZ0-1遺伝子座を3'側プローブでサザンプロッティングした結果、野生型遺伝子座から得られる6.3-kbのバンドと遺伝子破壊後の遺伝子座から得られる4.7-kbのバンドが得られた（レーン13, 15, 17を除くすべてのレーン）。レーン13, 15, 17はターゲッティングされなかったクローンである。176個のG418耐性コロニーの中で、相同組換えが一度起こっていたクローンは167個であった。

10 図3は、マウス上皮細胞株Eph4におけるZ0-1遺伝子の遺伝子ターゲッティングについて、マウスZ0-1遺伝子座、ターゲッティングベクター、遺伝子破壊後の制限酵素地図を示す。

15 開始コドンは第1エクソンに存在する。ネオマイシンカセット (LacZ/ β -geo/polyA) を中央に含むターゲッティングベクターは第2エクソンの一部を除く形で作られている。サザンプロッティングに用いられた5'側プローブを黒線で示した。

20 図4は、マウス上皮細胞株Eph4におけるZ0-2遺伝子の遺伝子ターゲッティングについて、マウスZ0-2遺伝子座、ターゲッティングベクター、遺伝子破壊後の制限酵素地図を示す図である。ネオマイシンカセット (IRES/ β -geo/polyA) を中央に含むターゲッティングベクターは第3エクソンを除く形で作られている。サザンプロッティングに用いられた3'側プローブを黒線で示した。

25 図5は、図4で示されるプローブを用いた際のサザンプロッティング解析の結果を示す写真である。

図6は、マウス上皮細胞株EpH4におけるDisabled-2遺伝子の遺伝子ターゲッティングについて、マウスDisabled-2遺伝子座、ターゲッティングベクター、遺伝子破壊後の制限酵素地図を示す図である。ネオマイシンカセット（IRES/β-geo/polyA）を中心としたターゲッティングベクターは第3エクソンを除く形で作られている。サザンプロットティングに用いられた5'側プローブを黒線で示した。

図7は、図6で示されるプローブを用いた際のサザンプロットティング解析の結果を示す写真である。

図8は、エレクトロポレーションにおける電圧、コンデンサー容量がG418耐性コロニーの数に及ぼす影響を示すグラフである。

Z0-1に対するターゲッティングベクターを様々な電圧、コンデンサー容量で遺伝子導入を行い、G418で選抜し、コロニー形成後その数を計数した。電圧、コンデンサー容量が大きいほどコロニー数が多いことがわかる。

図9は、Z0-1シングルノックアウトEpH4細胞における遺伝子導入結果を確認するためのサザンプロットティング解析の電気泳動写真である。

EcoRI消化したZ0-1遺伝子座を5'側プローブでサザンプロットティングした結果、野生型遺伝子座から得られる20.9-kbのバンドと遺伝子破壊後の遺伝子座から得られる5.3-kbのバンドが得られた（レーン1、2、11、12）。142個のG418耐性コロニーの中で、相同組換えが一度起こっていたクローンは16個であった。

20 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕 各種高効率ターゲッティングベクターの作製

25 (1) Z0-1ターゲッティングベクターの作製

Z0-1がコードされたゲノムを得る為に、入ファージ129/Svマウスジェノミック

クライブラリーに対して、マウス Z0-1 cDNA プローブを用いてスクリーニングし、4つの重複するゲノム断片を得た。制限酵素によるマッピングと DNA シーケンスにより、マウス Z0-1 の genomic locus を決定した（図 1）。取得した Z0-1 遺伝子を含むゲノム断片は4個のエクソンからなり、エクソン 1 に開始コドンが 5 存在していた。

Z0-1 ターゲッティングベクターは第2エクソンの一部を除く形で設計した。このベクターはカセットとして、 β -geo(順に LacZ, neo, poly A)を含んでいる。第2エクソンの一部およびその上流を含む 5.1-kb の PstI-BsrDI 断片と、第2エクソン下流の 3.9-kb の PstI-SphI 断片を、上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした（図 1）。このターゲッティングベクターにより、相同組換えがターゲッティングベクターと Z0-1 遺伝子の間に起こると、エクソン 2 の一部を含む領域が除かれ、 β -geo が挿入される。

また、上記ターゲッティングベクターはカセットとして、ネオマイシンカセット(順に LacZ, neo, poly A)を含んでいてもよく、その場合、第2エクソンの一部およびその上流を含む 1.5-kb の Bsp1286I-Bsp1286I 断片と、第2エクソン下流の 8.5-kb の PstI-BamHI 断片を、上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした（図 3）。

(2) Z0-2ターゲッティングベクターは、第3エクソンを除く形で設計した。このベクターは、カセットとしてネオマイシンカセット(順に loxP, En-2, SA (splicing accepter), IRES (Internal ribosome entry site), β -geo, polyA, loxP)を含んでいる。なお、En-2はengrailed-2遺伝子のイントロンおよびsplicing accepterを含む配列であり、splicingの効果を高めていると考えられている。第3エクソンの上流の6.6-kbのKpnI-HindIII断片、および第3エクソン下流の2.6-kbのScaI-SpeI断片を、上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした（図 4 および 5）。このターゲッティングベクターにより、相同組換え

がターゲッティングベクターとZ0-2遺伝子の間に起こると、第3エクソンを含む領域が除かれる。

(3) Disabled-2ターゲッティングベクターは、第3エクソンを除く形で設計した。このベクターは、Z0-2と同様にカセットとしてネオマイシンカセット(順にloxP, SA, IRES, β -geo, loxP, polyA)を含んでいる。第3エクソンの上流および下流それぞれ3.9-kbの断片を上皮細胞株EpH4のゲノムDNAを鑄型としたゲノミック(genomic)PCRにより取得し、それぞれ上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした(図6および7)。その際、上流断片の3'側にEcoRVサイトを導入し、この新たに導入したサイトを利用することにより、サザンプロット解析を行った。このターゲッティングベクターにより、相同組換えがターゲッティングベクターとDisabled-2遺伝子の間に起こると、第3エクソンを含む領域が除かれる。

15 [実施例2] 遺伝子ターゲッティング

Z0-1ターゲッティングベクターは5'相同領域断片の5'側に存在するuniqueサイトのSacIIで直線化(linealize)した。その後、7~8回passageしたES細胞へGene Pulser(Bio-Rad Laboratories)を用いてエレクトロポレーションを行い、遺伝子導入した。これらのES細胞は通常培地で、feeder細胞の上で36~48時間培養した。次に175mg/mlのG418中を含む培地で7~13日培養した。G418耐性コロニーを分離し、3'側相同領域断片の外側に対するゲノム断片(290bp)を用いたサザンプロットによりスクリーニングを行った。正しく相同組換えが起こったクローンはゲノムをPvuIIで消化すると、野生型では、6.3-kbの断片が、相同組換えが起こったアリル(allele)では4.7-kbの断片が認められた(図2)。176個のG418耐性コロニーの中で、相同組換えが一度起こっていたクローンは167個であった。すなわち約95%の効率でターゲッティングが起

- 20 -

ることが確認された。このことはこのターゲッティングベクターが通常に比べ、高い相同組換え効率があることを示している。

既に本発明では、他の細胞株 F9 teratocarcinoma cell においても、高効率に相同組換えによる ZO-1 遺伝子の遺伝子ターゲッティングが起こることも確認している。
5

〔実施例3〕 遺伝子ターゲッティングのためのエレクトロポレーションの条件検討

マウス上皮細胞株Eph4に対する遺伝子ターゲッティング法を開発する為に、実
10 施例1に記載の高効率ZO-1ターゲッティングベクター（1.5kおよび8.5kの断片を
含むターゲッティングベクター）を用いてエレクトロポレーションの条件検討を行った。

マウスZO-1に対するターゲッティングベクターは3' 相同領域断片の3' 側に存在
するuniqueサイトのXbaIで直線化（linearize）した（図3）。このDNA（10 μ
15 g）を12時間、低Ca²⁺培地（5 μ M）で培養したマウス上皮細胞株Eph4（1x10⁷ cell
s）に対してバイオ・ラッド社のジーンパルサーIIシステム（パルスコントローラ
ーPLUS使用）を用いて、電圧、コンデンサー容量等の様々な条件でエレクトロポ
レーションを行い遺伝子導入した。導入後、通常培地中で、48時間培養後、0.4m
g/mlのG418を含む培地中で14日培養し、選抜をした。その結果、各条件に応じて
20 G418耐性コロニーの数に違いが認められた（図8）。このことは条件に応じてタ
ーゲッティングベクターの導入効率が異なることを示している。

次に各条件に応じたG418耐性コロニーを分離し増やしたものからゲノムを抽出
し、5' 側相同領域断片の外側に対するゲノム断片（280bp）を用いたサザンプロ
ットを行った。その結果、最も良く相同組換えが起こっていた条件は、0.45kV、
25 125 μ Fであった（表1）。

- 21 -

表1

電圧量、コンデンサー容量	ヒット数/試験クローン全数	ターゲッティング効率(%)
0.25kV, 125 F	0 / 6	0
0.25kV, 250 F	0 / 9	0
0.25kV, 950 F	1 / 18	5.5
0.35kV, 125 F	1 / 12	8.3
0.35kV, 250 F	1 / 31	3.2
0.35kV, 950 F	0 / 6	0
0.45kV, 125 F	4 / 46	8.6
0.45kV, 250 F	3 / 55	5.4
0.45kV, 950 F	0 / 0	0

この条件はES細胞における至適条件とは異なっていた。

5 この条件で再度Z0-1遺伝子座に対して遺伝子ターゲッティングを行った所、14
2クローン中16クローンで(11.2%)相同組換えが確認された。正しく相同組換
えが起こったクローンはZ0-1においては、ゲノムをEcoRIで消化すると、野生型
の20.9-kbのバンドに加え新たに5.3-kbのバンドが現れた(図9)。

10 産業上の利用の可能性

本発明のベクターを利用することにより、ES細胞に対して外来遺伝子をZ0-1
のアリルに容易に導入することが可能となる。本発明のターゲッティングベクタ

- 22 -

ーによって得られたシングルノックアウト ES 細胞、およびこのシングルノックアウト ES 細胞をマウスに戻して作製されたヘテロマウスにおいては、何ら表現型が見いだされないことから、Z0-1 の一方のアリルに外来遺伝子を導入することは細胞の機能には影響がないと考えられる。このことは外来遺伝子を発現させる場合、ゲノム構造の影響を考慮しなくても良い利点がある。すなわち、従来の 5 ブラスジェニックマウス作製法や細胞の安定なトランスフォーマント作製時の欠点が解決出来ることが期待される。

また、本発明の遺伝子ターゲッティング方法を用いることにより、上皮細胞において発現している遺伝子の機能を解析することが可能である。また、悪性腫瘍 10 形成に関わる遺伝子を破壊もしくはその変異体をノックインにより効率的にゲノム上に導入することができるため、遺伝子改変を行った上皮細胞を利用した薬剤スクリーニング系の開発が可能になるものと考えられる。

請求の範囲

1. 非ヒト動物の ZO-1 遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲッティングベクターであって、該外来遺伝子、および該 ZO-1 遺伝子の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするベクター。
5
2. 外来遺伝子の上流および／または下流に、ZO-1 遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する、請求項 1 に記載のベクター。
3. ZO-1 遺伝子の部分領域が、該遺伝子の第二エクソンまたは第二エクソンの一部を含む領域である、請求項 2 に記載のベクター。
10
4. 下記の (a) または (b) のいずれかに記載の DNA 断片が外来遺伝子の両脇にそれぞれ配置された構造を有する、請求項 3 に記載のベクター。
 - (a) ZO-1 遺伝子の第二エクソンの一部およびその上流を含む 1.5-kb の Bsp1286I- Bsp1286I 断片、および第二エクソンの下流の 8.5-kb の PstI-BamHI 断片
 - (b) ZO-1 遺伝子の第二エクソンの一部およびその上流を含む 5.1 kb の PstI-BsrDI 断片、および第二エクソンの下流の 3.9 kb の PstI-SphI 断片
15
5. 非ヒト動物の ZO-2 遺伝子もしくは Disabled-2 遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲッティングベクターであって、該外来遺伝子、および該 ZO-2 もしくは該 Disabled-2 遺伝子の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするベクター。
20
6. 外来遺伝子の上流および／または下流に、ZO-2 遺伝子もしくは Disabled-2 遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する、請求項 5 に記載のベクター。
25
7. 外来遺伝子発現非ヒト動物または外来遺伝子発現非ヒト動物細胞の作製用ベクターである、請求項 1～6 のいずれかに記載のベクター。

8. 外来遺伝子の上流に該遺伝子を転写し得るプロモーターを備えた、請求項1～7のいずれかに記載のベクター。
9. さらにマーカー遺伝子発現力セットを含む、請求項1～8のいずれかに記載のベクター。
- 5 10. マーカー遺伝子発現力セットの下流に外来遺伝子が隣接して配置された構造を有する、請求項9に記載のベクター。
11. 外来遺伝子がマーカー遺伝子発現力セットである、請求項1～6のいずれかに記載のベクター。
- 10 12. マーカー遺伝子発現力セットが薬剤耐性遺伝子発現力セットである、請求項9～11のいずれかに記載のベクター。
13. 薬剤耐性遺伝子発現力セットが β -geoを含むDNA断片である、請求項12に記載のベクター。
14. 非ヒト動物がマウスである、請求項1～13のいずれかに記載のベクター。
- 15 15. 上皮細胞に対する遺伝子ターゲッティング方法であって、電圧0.4～0.5kVおよびコンデンサー容量125～250 μ Fの条件によるエレクトロポレーションにより、ターゲッティングベクターを該細胞へ導入することを特徴とする、ターゲッティング方法。
16. エレクトロポレーションへ供される細胞調製液中のカルシウム濃度が5 μ M以下である、請求項15に記載の方法。
- 20 17. ターゲッティングベクターが、細胞の染色体上のZ0-1遺伝子、Z0-2遺伝子、またはDisabled-2遺伝子を標的とするものである、請求項15または16に記載の方法。
18. ターゲッティングベクターが、請求項1～13のいずれかに記載のベクターである、請求項15または16に記載の方法。
- 25 19. 上皮細胞が高等動物細胞由来である、請求項15～18のいずれかに記

- 25 -

載の方法。

20. 高等動物がマウスである、請求項19に記載の方法。

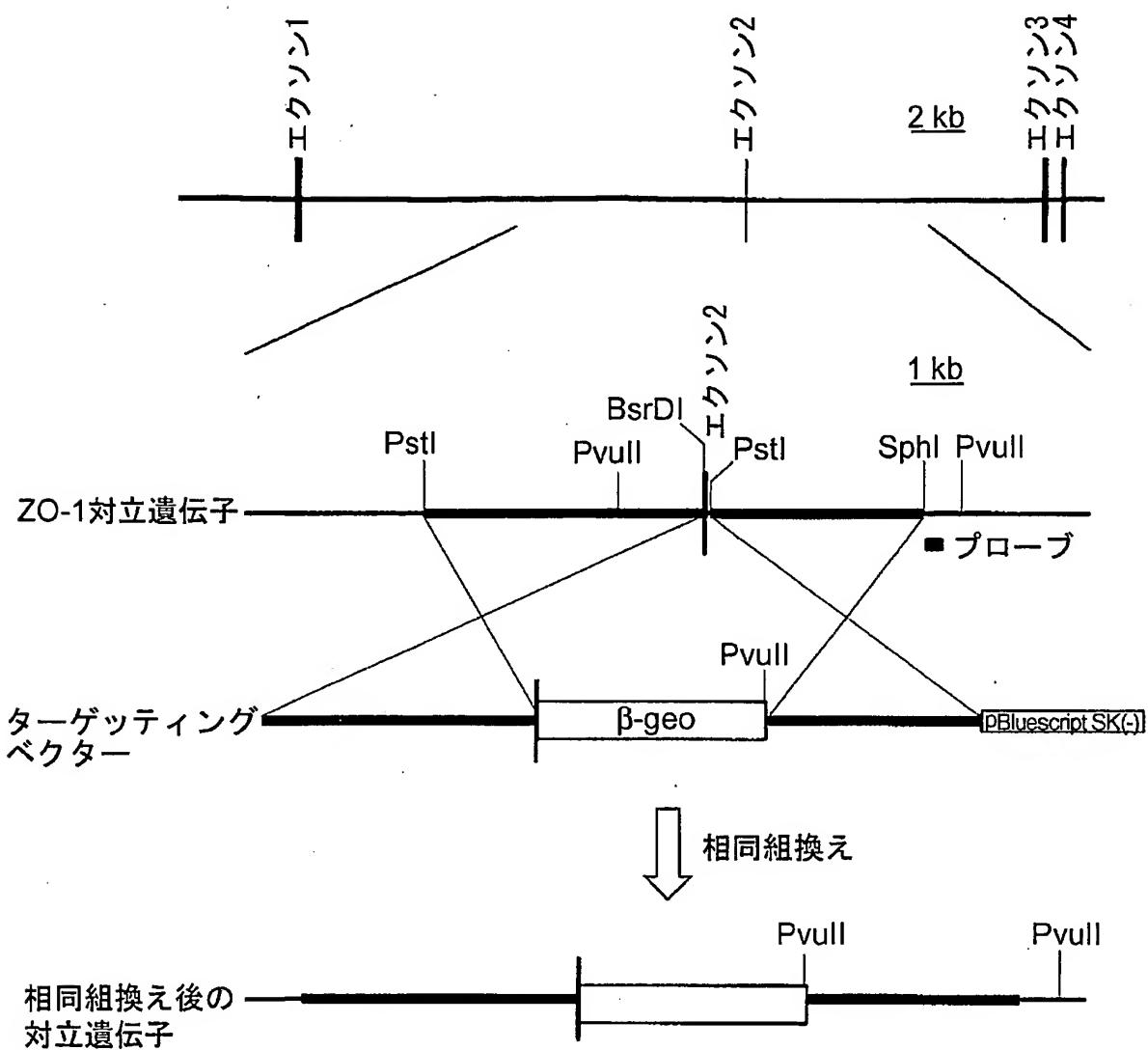
21. 細胞がマウス上皮細胞株EpH4である、請求項20に記載の方法。

22. 請求項15～21のいずれかに記載のターゲッティング方法によってタ

5 ゲッティングベクターを上皮細胞株へ導入することを特徴とする、染色体
が人為的に改変された上皮細胞株の製造方法。

1 / 9

図 1



2 / 9

図 2

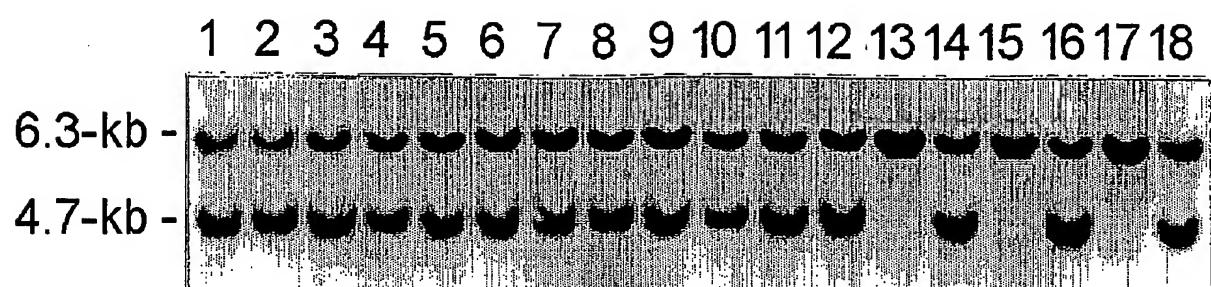


図 3

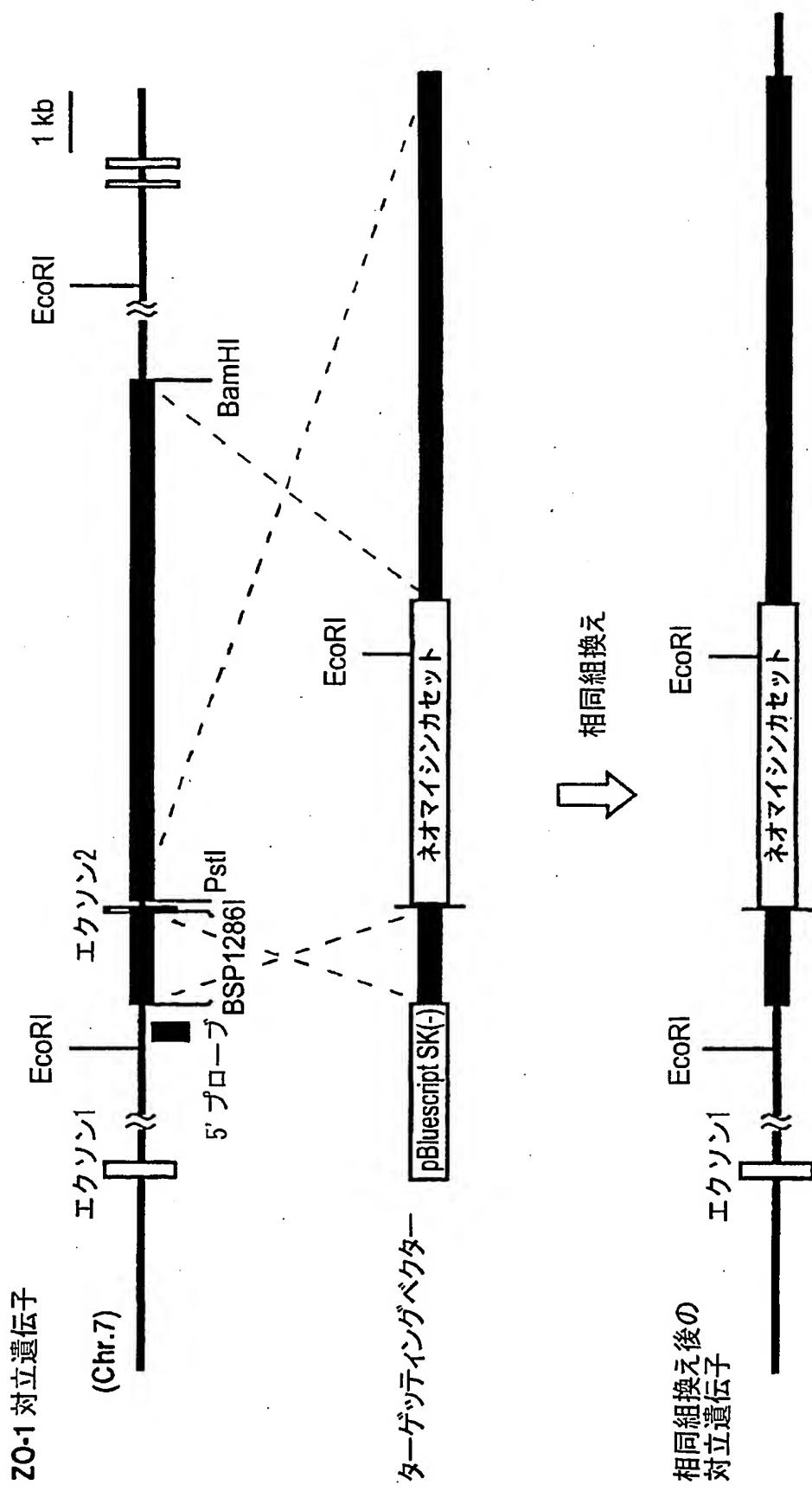
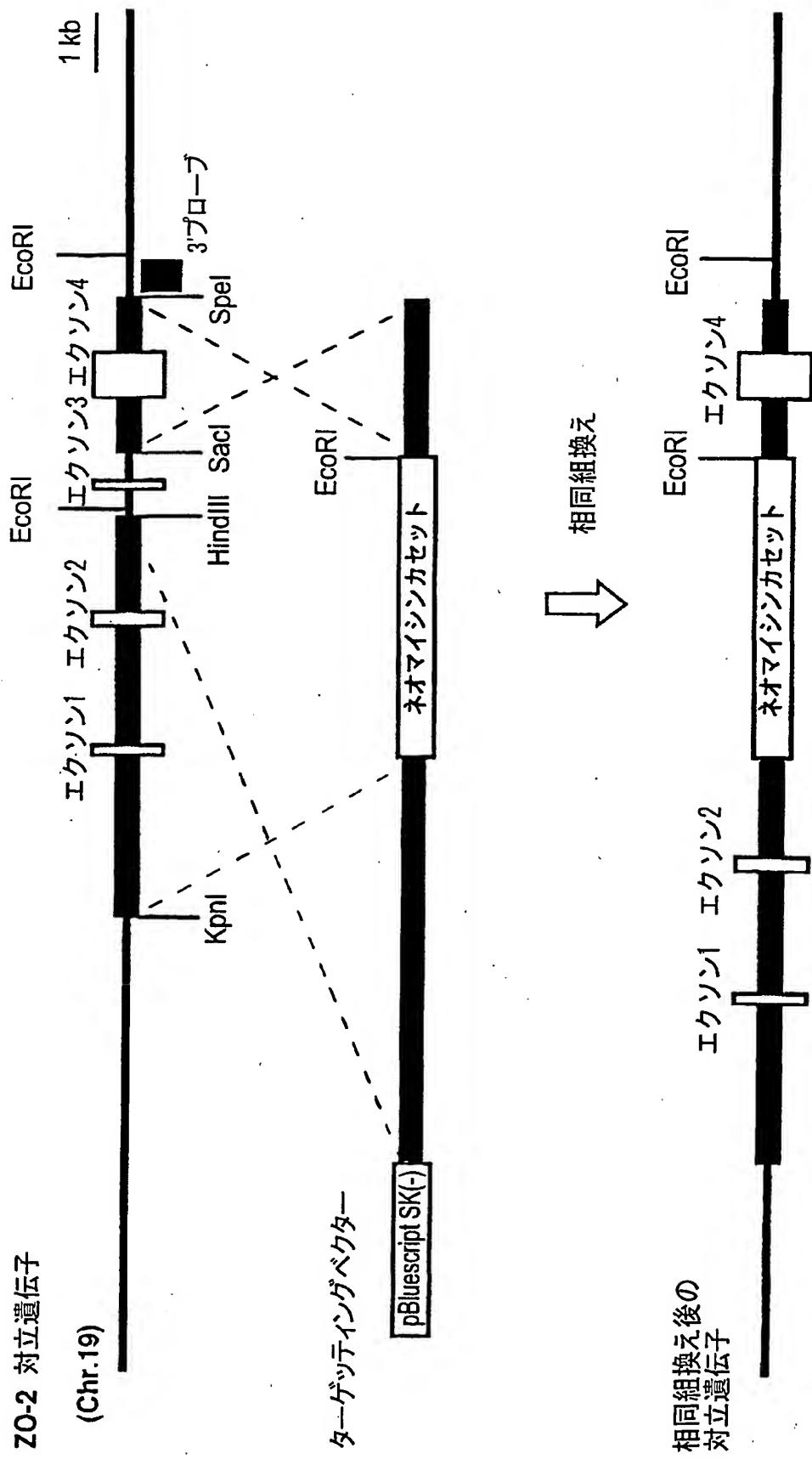


図 4



5 / 9

図 5

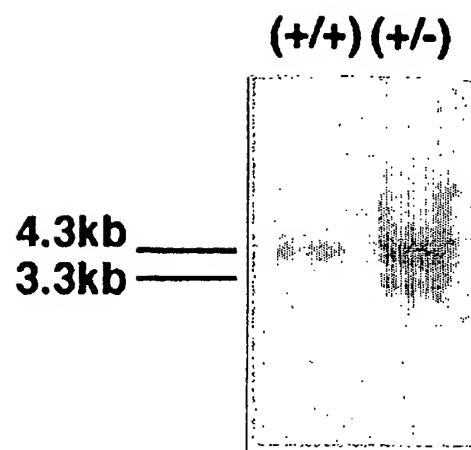


図 6

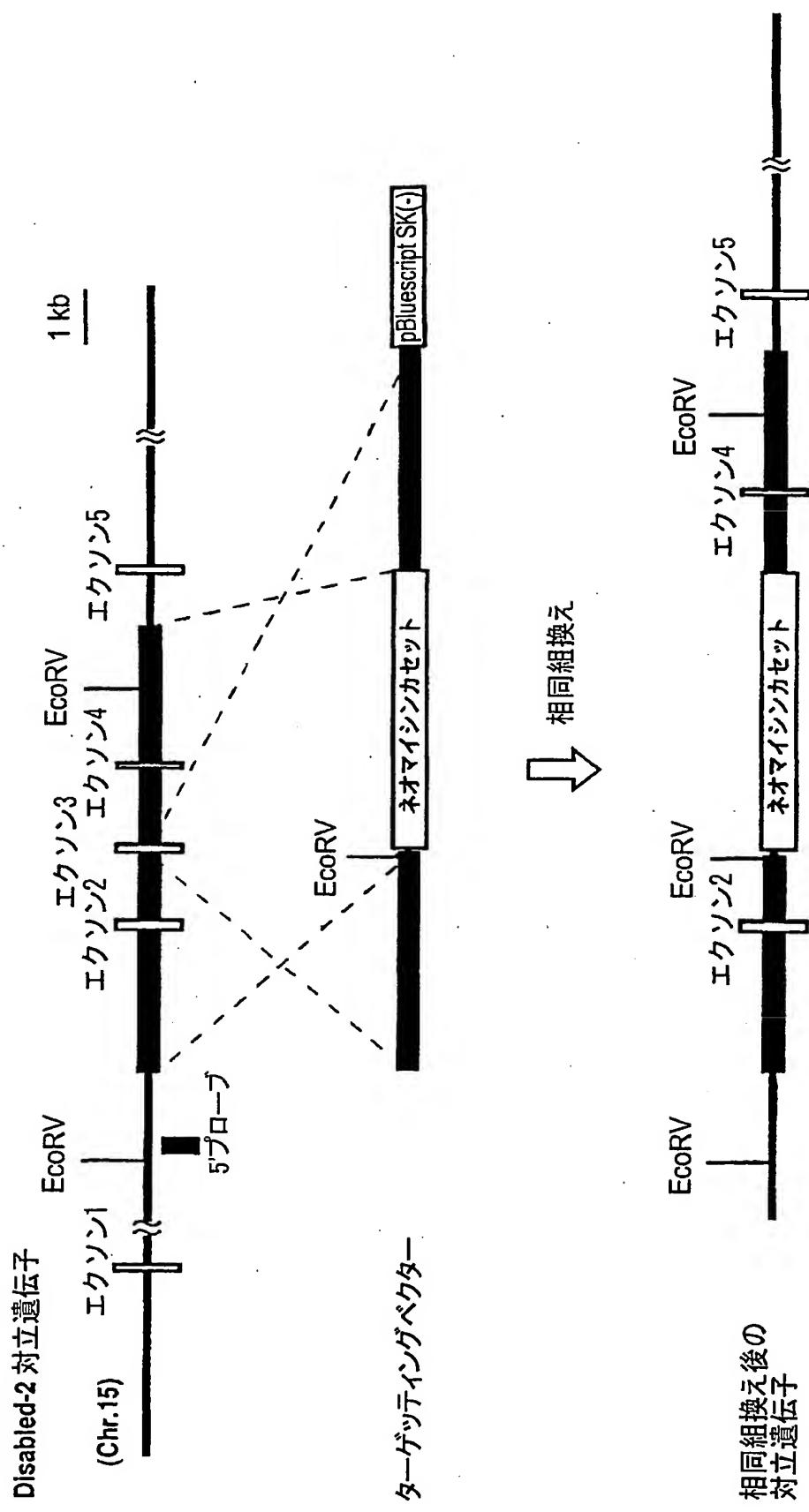


図 7

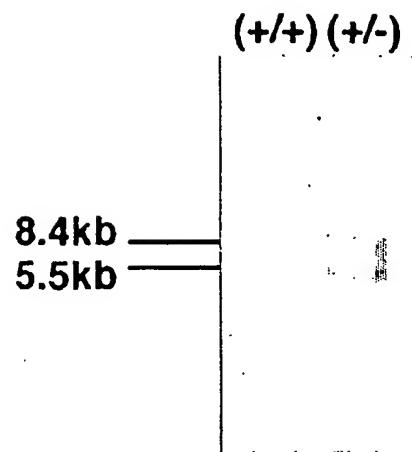
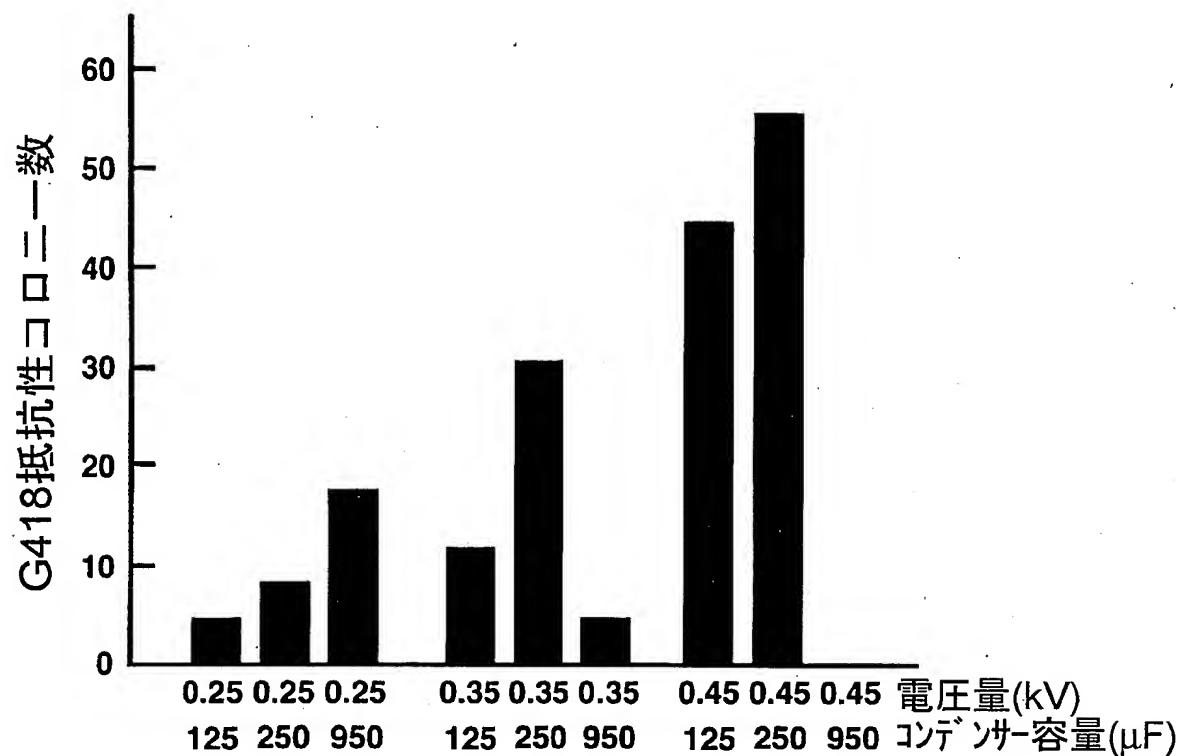
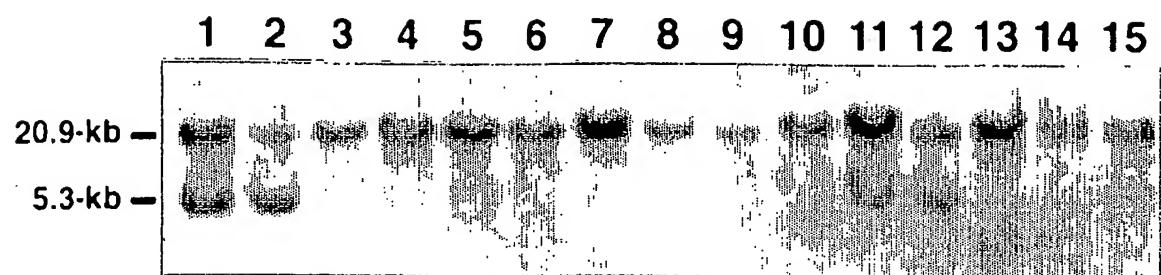


図 8



9 / 9

図 9



JC05 Rec'd PCT/PTO 17 JUN 2005
10/539534

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> High efficient gene targeting vector, and method for high efficient gene-targeting in epithelial cell line

<130> E1-A0204P

<140>

<141>

<150> JP 2002-371621

<151> 2002-12-24

<150> JP 2003-76877

<151> 2003-03-20

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 7046

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cgccctgagtt gcccgcgacg gctctgccccg ccgacggcac gtctctcgcc ggccgcgcgt 60
tccgggaaag ttacgtgcgg gagcaggctt tggaggagac gcccgagggt gtagggaca 120
gccggaggcc cgggtactgc ggagcggcga gccggcggag ggccggcggag gccgagcagg 180
cggccgggtg tgccccgcgg agaagcccg gccccggcga cgcttcccg acttttgtcc 240
cacttgaatc ccctccccgt gggccggcc tttccggcct ccccccgcctc tgccccgctc 300
gtccccggga gatgtttatg cggacggtgg cgtgaggagc gggccggccg gcggcgcgga 360
gtttcgggtc cgaggagctt cgccgcgcgc ggagagagac aagatgtccg ccagggccgc 420
ggccgctaag agcacagcaa tggagggaaac agctatatgg gaacagcaca cagtgacgct 480
tcacagggtc cctgggttg gatttggaat tgcaatctct ggtggaagag ataatcctca 540
ttttcagagt gggaaacctt ccatagtgat ttctgtatgt taaaaggag ggccagctga 600
aggacagcta cagaaaaatg accgagttgc aatggtaac ggagttcaa tggataacgt 660
tgaacatgct ttgtgttc agcagctaag gaagagtggg aaaaacgcaa aaattactat 720
ccgaaggaag aagaaagttc agatccctgt aagtccacca gatcctgagc cgggtgtctga 780
taatgaagac gatagttatg acgaagaagt gcatgacccca agagctggcc gcggtgcctt 840
agcgaacaga aggagcgaga agagctggc aaggatagg agtgcagca gggagaggag 900
cctgtccctt cgctcgacca ggcggccgt ggcctccagt cagcccgcaa agccaccaa 960
ggtcacactg gtgaagtctc ggaaaaatga agaatatggt cttcgaccgg ccagccacat 1020
atttgtaaag gaaatttcac aagatagttt ggcagcaaga gatggtgaca ttcaagaagg 1080
ggatgttgtc ttgttgtaa atggtaatgt gacagaaaat atgtcattga cagatgcaaa 1140
aacactgata gaaaggtcta aaggcaagtt aaaaatggta gtgcaaagag atgagcgggc 1200
taccttactg aacgtccctg accttgcga tagtatccat tctgctaatt cctcgaaag 1260
agatgacatt tcagaaattc agtcaactgc gtcagaccat tcaggtgcgt cgcatgacag 1320
gccaccccgcc cgccgcgcgt cacgatctcc tgaccaacgt tcagagccct ccgatcattc 1380
cacgcagtct ccacagcagc ccagcaatgg cagtctccgg agcagagagg aagagcgaat 1440

3 / 6

gtctaaacct gggccatct caactccgt aaaacatgt aacgatcatc cacccaaagc 1500
agtggaaaga gttacagttg agaaaaatga gaagcagacg cccactctc cagaaccgaa 1560
acctgtgtat gctcaagttg gacaaccaga tgtggattt cccgtcagcc ctctgtatgg 1620
tgctctgcct aattcagctc atgaagacgg gatacttagg cccagcatga aactggtaaa 1680
attcagaaaa ggagatagtg tgggttgcg actagcttgt ggaaatgtg tcggaatatt 1740
tgtagctggc gttctagaag atagccctgc agccaaagaa ggcttagagg aaggtgatca 1800
aattctcagg gtgaacaatg tagatttcac aaatatcata aggaagagg ccgtccttt 1860
cctcccttgc ac cccctaaag gtgaagaagt gaccatactg gctcagaaga agaaggacgt 1920
ttatcgccgc attttagaaat cagatgttagg agattcattc tatatttagaa cgcatttga 1980
ataatgaaaaaa gaatctccct acggacttag tttaacaaa ggagaggtgt tccgggtcgt 2040
ggatacttta tacaatggaa agctggctc ttggcttgcc attcgaattt gcaaaaatca 2100
taaggaggta gaacgaggca tcatccaaa taagaacaga gctgaacagt tagccagtgt 2160
acagttacaca ctccaaaga cagcgggtgg tgatcggca gacttctgga gtttcgagg 2220
tcttcgcagc tccaagagaa atcttcgaaa aagcagagag gacttgcag ctccagg 2280
tcaaactaag ttccctactt atgaaagggt ttttcttcga gaagctggat tcctaagacc 2340
tgtaaccatc ttggaccaa tagctgtatgt tgccagagaa aagttggcaa gagaggagcc 2400
agatatctat cagattgcaa aaagtgaact acgagacgct gggactgacc atcgtagctc 2460
tggcatcatt cgccttcata caataaagca aatcatagat caggataaac atgctttatt 2520
agatgttaacg ccaaattgcgg ttgatcgtct taattatgcg cagttgtatc caatttgtt 2580
gttccttaac cctgactcta agcaagggtt aaaaacaatg aggttggat ttttgcgg 2640
gtctcgaaa agcgccagga agcttatgtt acgctctcat aagttcgta agaacaatca 2700
ccatctcttc acaactacaa ttaacttaaa ctcaatgaat gatggttggt acggtgccct 2760
gaaagaagcg attcagcagc aacagaacca gctgggtgtgg gtctctgagg ggaaggcgga 2820
tggtgctaca agtgtatgacc ttgatttgca tgacgatcgt ctgtcctacc tgcagcccc 2880
aggtagtgag tactcaatgt atagcacgga cagtagacac acttctgact atgaagacac 2940
agatacagaa ggcggggcct acactgatca agaacttagat gaaactctta atgatgaggt 3000

ggggactccc ccggagtctg ccattacacg gtcctctgag cctgtaagag aggattcctc 3060
tggaaatgcat catgaaaacc agacatacc acccttactca ccacaagcgc agccacaaggc 3120
tattcataga atagactccc ctggacttaa gccagccct caacagaaag cagaaggcctc 3180
atctccagtc ccttacctt cgcctgaaac aaccccagca tcatcagcct ctgcagttaa 3240
tcataatgtc agtgttaacta atgtcagcct ggaggagcct gccccagccc ctcccaccc 3300
gcacgcatca cagcctgggtt gtttaggagc accaagtgtt gaggcagctc acgttaggtt 3360
cagaggtgaa ggaccaccat tgccgcccga tgcagaccca gcaaagggtt acaggaagga 3420
gccatattctt gaagaaatga tgagacaaaa ccatattttt aaacaaccag ctcttggtca 3480
cccagggcag aggccagata aagagccaaa tctagcctat gaaccccaac ttccatata 3540
agaaaaacaa gccagcagag accttgagca gccgtcatac aggtatgagg tctcaagcta 3600
cacagaccag ttttctcgga actatgacca tcgcctacgg tttgaagatc gaatccctac 3660
ctatgaagac cagtggtcat attatgtga caaacagccc taccaacccctc ggccttttga 3720
gaatcagcat ccccggagacc tggactccag acaacatccc gaagaggctt cagaacgagg 3780
ttatttccag cgaaaaatgcg agccagcccc tctgtcgatc gacagtagaa cacgctatga 3840
gcagctgcct cgaacctcta ctctacgaca tgaagagcag ccagccccctg catatgaggt 3900
gcacaacagg tacaggccag aggcacagcc ctattcttca acaggcccta agtcatctga 3960
gccccaaacccag tactttgacc agtaccccgcg aagttatgag caagttccac caccaggctt 4020
tacctccaaa acaggccatt acgagccctt ccatggtct gcagttgtcc ctccctgtat 4080
accttccttca caacaaaacg cagaagtcct ggcgtcggtt accaaaccac agcctccacc 4140
ccccaaacccta actgaggagg aggaggatcc agcaatgaaa ccacagtctg tgctcaccag 4200
agtcaaaaatg tttgaaaaca aaagatctgc gtcttggag aacaagaaag atgtgaatga 4260
caactggcagc ttcaaggcctc cgaaagtagc atctaaacctt ccaggtgtttt ctcttgctgg 4320
cccttaaacctt gtccctcaga gtcagtttag tgagcacgac aaaacgctct acaggctccc 4380
agagccctcag aaacctcaag tgaagccacc cgaagatattt gttcgatcaa atcattacga 4440
cccttgaagag gatgaagaat attaccggaa acagctctcc tactttgacc gaagaagttt 4500
tgagagcaag ccttctgcac atcttcctgc tggccatcac tcagagcctg ctaagccagt 4560

5 / 6

ccattctcag agccagccca acttccctag ttactctca aaggaaaac ccgaaactga 4620
tgctgtggat agatcattca gtgagaaaacg ttatgatcca gcccaggcca cgcctctcc 4680
tcctccgttg ccctcacagt acagccagcc agtccacact ctgtccagct cttctctcca 4740
catacattcc aagggcgccc agggtaagg caactcagta tcattggatt ttcagaactc 4800
atatatgtcc aaaccagacc cacccttccatc tcagagtaaa ccagcaactt tcagaccacc 4860
aactcgagaa gaccccccctc agactttcta tccgcagaaaa agttcccgac acaaagctcc 4920
agttAACGGA gctgagcaga ctcagaaaaac catcactccg gtgtacaatc gattcacacc 4980
aaAGCCGTAC acaagttctg cccggccatt tgaacgaaaaa tttgaaagtc cgaagttcaa 5040
ccataatctt ctgccaagtg aaactgtaca taaacctgaa ttgtcttcaa aaactccac 5100
ttccccaaaa actcttatga aagctcaatag ttcaacacag cctccagagt ttggcagtgg 5160
agttgaaact ttctctgttc acacagataa gcctaaatataa caaatgaata atatcagcac 5220
catgcctaaa gctgtccctg tgagtccctc agctgtggaa gaagatgaag atgaggatgg 5280
tcatactgta gtggctacag ctctgtggcat ttttaacacgc aatgggtggtg ttttgaggttc 5340
catagaaacc ggtgttagta taattatccc acaaggagcc attcctgaag gaattgagca 5400
agaaaatctat ttcaaagttc gcagagacaa tagcatttcc ccaccttttag ataaagagaaa 5460
aggtgaaact ctgctgagcc cccttagtgcat gtgtggggcc catggcctca agttcctgaa 5520
ccccgtggag ctacgcttgc cacactgtga ccctaaaacc tggcaaaaca agtgcctcc 5580
ttggagatccg aattaccttg ttggagccaa ctgtgtttct gtcctgatttgc accactttta 5640
attcttagtg tataggaact ggactaagca atgtgaacgt ggattgaact tactaaatct 5700
aaatggaacc actctaataatgtt gtattatatt ttcttagaaat ttataactgca attggtagta 5760
ttaagcattt gttggaaactg atgaaggtaa ggcgcgttc ccctgagccca cggtcagaaaa 5820
gcatgctaca agctatgtgt tattgagtga agaactgtca ggcattggct agaggttcaa 5880
agatattttt gctttgttaat gattttgtat cttttttatg gtcactgctt aacttcacat 5940
actgatttcc gttaaaaata ccagccagta aatgggggtg cattttagttt ctgttcttc 6000
caaagtacac tcaaagttta ttatggccctt ggccttagcat acacattta ttttattata 6060
catgaggtaa tgtgcacaca tttttacaa atgcacccgg aatataaactc cagttatgt 6120

6 / 6

gatttaacag aaatgtacag cagggggatt tataacttgg ggagggaggg tcaaatgaag 6180
acaattactt attgtatatg aaaacacatt tcttttaggg aaggacacca aagcatgtga 6240
gcccggttca tggcctctga atctataat taacatatca ccacagacat gtaaccagca 6300
ggaatgcctt accctagttgg gttaattct tccatcattt cgctgtgtat tactaagttt 6360
ttatgagttc tgtgcataatc tagatactgt accatggaaa agactgagta gattgtggac 6420
ttgatggttt cagaaatgtg caaattacct ggaagaaaaat aatggtgtga cttaaaatat 6480
tttttgaca gggggagtgg cagtcctctg ttctttggc tgtgcatactg agatgttga 6540
tgcttcagg acgcatgtac ataatgcgtg cataccactt ttgttcttgg tttgtaaatt 6600
aactttata aactttacct ttttatacat aaacagaacc aagtttctaa ggctaccctt 6660
gtattcttc ctgtacctct tgaggcttga actttgacct ctgcagcaat aaagcagcat 6720
ttctacacat acaaggtcat ttttctaaga aaaagaatgc acagagttgt tacatttta 6780
agtgcgtcat taaaagata cagttactct agtttgatta aattcttgca aagtatccct 6840
tctgtaaaat ttgtgataca atactgtgcc ctaaagtgtt ttttttact aatagacagt 6900
ttattatggc acatcagcac gatttctgtt tagataatac accactacat tctgttaata 6960
atcagtaggt gtgaaaggat ttctttgtg gttattaaaa aaaaatctca aatttctaaa 7020
tctgcaagaa taaaacttt taaaat 7046

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/85

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Montrose-Rafizadeh C. Kole et al., Gene targeting of a CFTR allele in HT29 human epithelial cells, 1997, J.Cell.Physiol., Vol.170, pages 299 to 308	1-4, 7-14
A	SAITO M., et al., Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions, 1998, J.Cell. Biol., Vol.141, pages 397 to 408	1-4, 7-14
A	ITO M. et al., The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immuno electron microscopy 1993, J.Cell.Biol., Vol.141, pages 397 to 408	1-4, 7-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
31 March, 2004 (31.03.04)Date of mailing of the international search report
13 April, 2004 (13.04.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16549

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	U, eda K., et al., Establishment and characterization of ZO-1-deficient F9 cells, 2003, August, Cell Structure and Function, Vol.28, p. 329 1p-61	1-4, 7-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16549

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The vectors as set forth in claims 1 and 5 are common to each other in nothing but being a gene targeting vector.

However, it is publicly known to prepare a gene targeting vector and thus the above matter is not a special technical feature in the meaning as specified in the second sentence of PCT Rule 13.2. Further, there is no other matter seemingly being a special technical feature in the meaning as specified in the second sentence of PCT Rule 13.2 between the inventions relating to gene targeting vectors for introducing a foreign gene into Z0-1, Z0-2 or Disabled-2 gene region as set forth in claims 1 and 5.

Such being the case, these inventions are not (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1 to 4 and the parts depending on claims 1 to 4 in claims 7 to 14.

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16549

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The inventions as set forth in claims 1 and 5 and the invention as set forth in claim 15 are common to each other in nothing but relating to a gene targeting method.

However, a gene targeting method is publicly known and thus the above matter is not a special technical feature in the meaning as specified in the second sentence of PCT Rule 13.2. Further, there is no other matter seemingly being a special technical feature in the meaning as specified in the second sentence of PCT Rule 13.2 among these the inventions.

Such being the case, these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but as involving 4 inventions different from each other.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.C1' C12N15/85

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.C1' C12N15/85

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Montrose-Rafizadeh C, Kole et al., Gene targeting of a CFTR allele in HT29 human epithelial cells, 1997, J.Cell.Physiol., Vol.170, p.299-308	1-4, 7-14
A	Saitou M. et al., Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions, 1998, J.Cell Biol., Vol.141, p.397-408	1-4, 7-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 31.03.2004	国際調査報告の発送日 13.4.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9548

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Itoh M. et al., The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy 1993, J. Cell Biol., Vol. 141, p. 397-408	1-4, 7-14
PA	Ueda K. et al., Establishment and characterization of ZO-1-deficient F9 cells, 2003 Aug., Cell Structure and Function, Vol. 28, p. 329 1P-61	1-4, 7-14

第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

クレーム1及び5に記載されたベクターは、遺伝子ターゲッティングベクターであることにおいてのみ共通する。

しかしながら、遺伝子ターゲッティングベクターを調製することは公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、クレーム1及び5に記載された、Z0-1、Z0-2又はDisabled-2遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲッティングベクターに関する発明の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

よって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえない。
(特別ページに続く)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-4、請求の範囲7-14のうち請求の範囲1-4を引用する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄 (続き)

またクレーム1及び5に記載された発明と、クレーム15に記載された発明は、遺伝子ターゲッティング方法に関連していることにおいてのみ共通する。

しかしながら、遺伝子ターゲッティング方法は公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そしてこれらの発明の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

よって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいはず、異なった4個の発明からなる発明群であると認める。